

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce



**Molekulární diagnostika folikulárních lymfomů**

**Molecular diagnostic of follicular lymphoma**

Zuzana Imryšková

V Praze 2007

vedoucí práce

RNDr. Markéta Kalinová

## **Abstrakt**

Metody molekulární genetiky se v posledních desetiletích významně prosazují v hematologii a onkologii. Je tomu tak i při hledání způsobu včasné diagnostiky a možné léčby folikulárních lymfomů, druhého nejčastějšího Non-Hodkinového lymfomu, který má narůstající incidenci.

V této práci shrnujeme poznatky z oblasti molekulární diagnostiky folikulárních lymfomů. V jednotlivých kapitolách práce se věnujeme charakteristice folikulárních lymfomů a jejich genových změn, roli genu BCL-2 v lymfoproliferaci a metodologickým možnostem monitorování reziduální nemoci. Naším zájmem je detekce translokace t(14; 18), která se vyskytuje až u 90% případů pacientů s folikulárním lymfomem. Jejím následkem je právě nadměrná exprese proteinu Bcl-2, který zabraňuje buňce v apoptóze. Zabýváme se také rolí klonálně-specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory na DNA úrovni jako jednoho z cílů a znaků pro sledování minimální reziduální nemoci.

## **Klíčová slova**

Folikulární lymfom, Bcl-2, klonalita B lymfocytů, minimální reziduální nemoc, translokace t(14;18)

## **Abstract**

The methods of the molecular genetics have been notably gaining ground during the past decades in the fields of hematology and oncology. It is so in the process of seeking the way of timely diagnostics and possible treatment of follicular lymphomas, the second most frequent non-Hodgkin's lymphoma, which has an increasing incidence.

In this work we sum up the findings in the field of the molecular diagnostics of follicular lymphomas. In individual chapters we follow the characteristic of follicular lymphomas and their genetic changes, the role of the BCL-2 gene in lymphoproliferation, and the methodological possibilities for the monitoring of residual disease. We focus on the detection of the t(14;18) translocation, which can be found at up to 90% of the patients who suffer from the follicular lymphoma. This translocation leads to the abnormal expression of protein Bcl-2, which prevents the cell from apoptosis. We also deal with the role of clonally-specific gene rearrangements for immunoglobulins and T-cell receptors on the DNA level as one of the goals and signs for the observation of minimal residual disease.

## **Key words**

Follicular lymphoma, Bcl-2, gene rearrangement B-lymphocyte, minimal residual disease, translocation t(14;18)

<b><u>Úvod.....</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b><u>Literární přehled .....</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b><u>1 Nádory lymfatických uzlin a extranodální lymfatické tkáně .....</u></b>	<b><u>7</u></b>
1.1 Folikulární lymfomy .....	8
1.1.1 Charakteristika onemocnění.....	8
1.1.2 Klinický obraz FL .....	10
1.1.3 Léčba FL .....	11
1.1.4 Prognóza FL.....	11
<b><u>2 Translokace t(14;18).....</u></b>	<b><u>13</u></b>
2.1 Role genu BCL-2 v apoptóze.....	14
2.1.1 Proteinová rodina Bcl-2 .....	14
2.1.2 Role genu BCL-2 a proteinu Bcl-2 u FL.....	15
<b><u>3 Klonalita B-lymfocytů .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
3.1 Buňky imunitního systému.....	17
3.2 Receptor B lymfocytů .....	17
3.3 Struktura imunoglobulinu .....	17
3.4 Přestavba B lymfocytů.....	18
3.4.1 Proces rekombinace B lymfocytů .....	19
3.4.2 Proces rekombinace T lymfocytů .....	21
<b><u>4 Minimální reziduální nemoc.....</u></b>	<b><u>22</u></b>
4.1 Kvantitativní detekce MRN .....	22
4.2 MRN-FL .....	23
<b><u>Molekulární metody .....</u></b>	<b><u>25</u></b>
<b><u>5 Roztoky a chemikálie pro purifikaci a separaci nukleových kyselin.....</u></b>	<b><u>26</u></b>
5.1 Roztoky pro izolaci buněk.....	26
5.2 Roztoky pro izolaci RNA.....	26

5.3	Roztoky pro izolaci DNA.....	26
5.4	Roztoky pro elektroforézu .....	27
5.4.1	Polyakrylamidový gel:.....	27
5.4.2	Agarózový gel:.....	27
<b>6</b>	<b><u>Purifikace a separace nukleových kyselin .....</u></b>	<b>28</b>
6.1	Lyze buněk a tkání.....	28
6.2	Izolace nukleových kyselin z tkáně zalité v parafinovém bloku .....	28
6.2.1	Izolace genomové DNA.....	28
6.2.2	Izolace RNA .....	29
6.3	Izolace nukleových kyselin ze zmražené tkáně a jaderných buněk.....	29
6.3.1	Izolace RNA .....	29
6.4	Izolace DNA.....	29
<b>7</b>	<b><u>Polymerázová řetězová reakce .....</u></b>	<b>31</b>
7.1	Nmyc/bglob.....	31
7.2	CTRL .....	31
7.3	Detekce IgH, IgK klonality.....	33
7.4	detekce t(14;18) MBR, MCR .....	36
<b>8</b>	<b><u>Elektroforéza .....</u></b>	<b>37</b>
8.1	Elektroforéza na agarózovém gelu .....	37
8.2	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu .....	37
	<b><u>Budoucí cíle a směřování práce .....</u></b>	<b>38</b>
	<b><u>Poděkování .....</u></b>	<b>39</b>
	<b><u>Seznam použitých zkratk.....</u></b>	<b>40</b>
	<b><u>Seznam použité literatury.....</u></b>	<b>42</b>

# Úvod

Onemocnění, dnes charakterizovaná jako lymfomy, bylo poznáno již v 19. století. Folikulární lymfom, vzhledem ke své morfologické charakteristice, byl jako jednotka poznán velmi záhy, již počátkem 20. století a byl zahrnut i do všech následně vytvořených klasifikací lymfomů, i když někdy pod jinými názvy. Nyní se používá klasifikace lymfomů podle World Healthy Organisation (Jaffe *et al.*, 2001). Folikulární lymfomy patří mezi Non-Hodkinovy lymfomy, které tvoří asi 2% všech nově zjištěných zhoubných nádorů v České republice, folikulární lymfomy patří mezi nejčastější z nich. Klinický obraz je velmi variabilní (Mayer, 2001). I z tohoto důvodu je stále více kladen důraz na molekulární metody, které v posledních desetiletích procházejí rychlým vývojem. Umožňují nejen přesnou diagnostiku, ale i možnost sledování dalšího vývoje choroby, které je důležité pro individuální sledování pacienta s diagnózou folikulárního lymfomu a směřují k individuální terapii.

Mezi cíle bakalářské práce patří osvojení práce s literaturou a elektronickými databázemi, na jejímž základě shrnujeme v literárním přehledu poznatky o folikulárních lymfomech a možnosti diagnostiky tohoto onemocnění. Základním principům molekulární diagnostiky a praktickému osvojení těchto metod pro následné zpracování vzorků a výsledků se věnujeme v metodické části.

V této práci se zaměřujeme na souhrn poznatků o folikulárních lymfomech. Obecná charakteristika tohoto onemocnění je shrnuta v druhé kapitole společně s krátkým přehledem současné klasifikace lymfomů. V následujících dvou kapitolách se zaměřujeme na cíle používané v molekulární diagnostice, translokaci t(14;18), jejímž důsledkem je nadprodukce proteinu Bcl-2, který inhibuje proces apoptózy a detekci klonálních přestaveb imunoglobulinů a T buněčných receptorů. Čtvrtou kapitola věnujeme základní charakteristice minimální reziduální nemoci, která umožňuje sledovat léčebnou odpověď pacienta a předpovídat průběh onemocnění. Zaměřujeme se na použití metody PCR v reálném čase a poznatkům o sledování minimální reziduální nemoci u folikulárních lymfomů. V metodické části, které je věnována sedmá kapitola, se zabýváme metodami pro diagnostiku folikulárních lymfomů, jenž používáme v laboratoři. Protokoly vycházejí ze standardizovaných postupů pro detekci klonálních B lymfoproliferací programu BIOMED-2 (van Dongen *et al.*, 2003). V závěru je krátce zmiňujeme budoucí směřování práce.

# **Literární přehled**

## **1 Nádory lymfatických uzlin a extranodální lymfatické tkáně**

Primární nádory uzlin a jiné lymfatické tkáně nazýváme lymfomy. Jejich klasifikace je neobyčejně složitá a neustále se mění. Nyní používaná klasifikace je dána podle World Healthy Organisation (WHO) (Jaffe *et al.*, 2001). Základní dělení lymfomů je na lymfomy Hodgkinovy a lymfomy non-Hodgkinova typu.

### **Hodgkinův lymfom**

Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů

Klasický Hodgkinův lymfom

### **Non-hodkinův lymfom**

Dělíme jej podle dvou nezávislých kritérií: podle původu na lymfomy z B nebo T/NK (natural kill cell) buněk, dále podle stupně zralosti na lymfomy z prekursorové B či NK/T buňky a lymfomy ze zralé B či T/NK buňky.

## **Lymfomy ze zralé (periferní) B buňky**

Lymfom z malého B lymfocytu / chronická lymfocytická leukémie

Folikulární lymfom

Lymfom z B buňky marginální zóny

Tricholeukemie

Lymfom z pláštěvé buňky

Difuzní lymfom z velké B buňky

Burkittův lymfom

Lymfomatoidní granulomatóza

## **Lymfomy ze zralé (periferní) T/NK buňky**

Extranodální lymfom z T/NK buňky

Lymfom z T buňky typu enteropatie

Periferní lymfom z T buňky

Anaplastický velkobuněčný lymfom

## **Lymfomy z prekursorové buňky, lymfoblastomy**

Lymfoblastická leukémie/lymfom z B buňky

Lymfoblastická leukémie/lymfom z T buňky

(Slater, 2005; Jaffe, 2001)

### **1.1 Folikulární lymfomy**

#### **1.1.1 Charakteristika onemocnění**

Folikulární lymfom (FL) je zařazen dle současné klasifikace WHO do skupiny Non-Hodkinových lymfomů (NHL) vznikající z B-lymfocytů. Nádorové buňky nesou stejnou IgH přestavbu V-D-J segmentů (viz. kap. 4). Toto onemocnění představuje okolo 22% NHL a je druhý nejčastější typ lymfomu vyskytující se v Evropě. Onemocnění postihuje především starší lidi s mediánem okolo 60 roku života, poměr pohlaví je 1:1,7 v neprospěch mužů. FL převážně postihuje lymfatické uzliny, ale i trávicí trakt, kůži, slezinu, kostní dřeň aj. FL vzácně onemocní mladí lidé pod 20 let, pokud jsou však postiženi, pak onemocnění převážně muži a nádor je lokalizován v oblasti hlavy a krku (Jaffe *et al.*, 2001).



Pro volbu terapie, stanovení prognózy a srovnání účinku léčebných zásahů se stanovuje rozsah nádorového onemocnění v době diagnózy, staging a růstový a invazivní potenciál, grading. Staging vychází z původní klasifikace Ann Arbor pro Hodgkinovu chorobu (viz. tab. č. 1), která začala být později používána i pro NHL. U FL je grading založen na sledování počtu centroblastů v zorném poli při cytologickém vyšetření (viz. tab. č. 2).

Rozdíl mezi grade 1 FL a grade 3 FL je založen na počtu centroblastů uvnitř novotvarových folikulů. Grade 3 FL je dále rozdělen na dva typy. Grade 3a FL je charakteristický směsí centrocytů a centroblastů, zatímco grade 3b se vyznačuje velkými centroblasty a nepřítomností centrocytů. Zda má tento rozdíl klinický význam je zatím nejasné. Některé studie uvádí, že grade 3a FL je příbuzný s nízkě agresivními lymfomy grade 1 a 2 FL, zatímco 3b FL je více příbuzný s difúzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma) (Winter *et al.*, 2004).

Stage	Popis
I	Postižení pouze jedné lymfatické oblasti
II	Postižení dvou lymfatických oblastí na stejné straně bránice
III	Postižení lymfatických uzlin na obou stranách bránice, které může být spojeno s postižením extralymfatického orgánu
IV	Difúzní postižení jednoho nebo více extralymfatických orgánů či tkání.

**Tabulka č.1** Klasifikace stagingu dle Ann Arbor (upraveno dle Coffey *et al.*, 2003)

Grading	Počet centroblastů v zorném poli
Grade 1	0-5 centroblastů
Grade 2	6-15 centroblastů
Grade 3	> 15 centroblastů
3a	Přítomné centrocyty a centroblasty
3b	Přítomné centroblasty

**Tabulka č. 2. Grading FL (Jaffe *et al.*, 2001)**

Pro FL grade I, II, IIIa je ve více než v 90% případech nalezena translokace t(14;18)(q32;q21), pro grade IIIb není tato translokace typická (Schraders *et al.*, 2005). Výjimečně je zjištěna translokace t(2;18)(p12; q21). Oba typy translokací způsobují přestavbu genu BCL-2 a následnou nadprodukcí proteinu Bcl-2 (viz. 3.2.). Méně často jsou přítomny změny na chromosomech 1, 2, 4, 5, 13 a 17 nebo adice chromozomů X, 7, 12, 18. Delece a jiné změny na chromosomu 9p zvyšují pravděpodobnost transformace FL v DLBCL. Abnormality v oblasti 3q27 nebo přestavbu genu BCL-6 najdeme v 15% případů FL, zatímco mutace na 5'konci genu BCL-6 jsou nalezeny až v 40% případů (Jaffe *et al.*, 2001). Vzácně se může FL transformovat v jiný typ lymfomu, příkladem může být transformace do Burkittova lymfomu po chemoterapeutické léčbě a ozařování (Takahashi, 2005).

Imunologické znaky, které na svém povrchu nesou lymfomové buňky, jsou obvykle povrchový imunoglobulin SIg<sup>+</sup> (IgM<sup>+</sup>/-IgD, IgG, zřídka IgA), Bcl2<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD5 a antigeny asociované s B buňkami (CD19, CD20, CD22, CD79a). Většina buněk nese i molekulu CD10. Protein Bcl-2 je exprimován ve většině případů, které se v grade I blíží 100%, oproti tomu kožní FL je negativní (Jaffe *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Klinický obraz FL

FL probíhají dlouhou dobu bezpříznakově. Vzácně jsou pozorovány i dočasné spontánní regrese nemoci, tedy zmenšení lymfatických uzlin. Po této fázi pomalu nastupují klasické B-příznaky typické pro NHL, mezi které patří opakující se nevysvětlitelné teploty přesahující 38 °C, noční pocení, nechtěný váhový úbytek (definovaný jako ztráta více než 10 % tělesné hmotnosti za posledních 6 měsíců), těžká a trvalá únava a vyčerpání, snížená chuť k jídlu. Pacienti se k lékaři nejčastěji dostávají pro zjištěné zvětšené periferní uzliny.

Někdy se diagnóza stanoví při pátrání po původu některého z uvedených B-příznaků. Někdy se nemoc projevuje difúzními bolestmi kloubů podobnými příznakům revmatoidní artritidy (Adam, Vorlíček *et al.*, 2001).

### **1.1.3 Léčba FL**

FL jsou až na výjimky dosavadními postupy nevyléčitelná onemocnění. U řady nemocných je možné dosáhnout výrazné léčebné odpovědi, což vede k eliminaci nebo zmírnění příznaků choroby. Léčebné postupy lze hodnotit nejen z pohledu celkového přežití, ale také z pohledu přežití bez známek choroby (Mayer, 2001).

Současné běžně používané léčebné postupy zahrnují radioterapii, protinádorovou chemoterapii, použití interferonu alfa, transplantaci kostní dřeně, využití monoklonálních protilátek zaměřených proti lymfomovým buňkám. Všechny postupy lze navzájem různě kombinovat. Například použití protilátky rituximab s chemoterapií zlepšuje léčebnou odpověď.

Do léčebných možností pokročilých onemocnění patří i vyčkávací strategie u nemocných, kteří se nacházejí ve fázi onemocnění bez klinických příznaků (Schüler, Dölken, 2005). Při randomizačních studiích nebyly nalezeny rozdíly v přežívání mezi vyčkávací strategií a úvodním agresivním postupem (Brice *et al.*, 1997; Zouny *et al.*, 1988; Mayer, 2001).

### **1.1.4 Prognóza FL**

Prognóza pacientů z hlediska četnosti léčebných odpovědí, délky bezpříznakového intervalu a celkového přežití je nejméně zlá z celé skupiny NHL. Průměrné přežití pacientů s FL se pohybuje kolem 8-10 let. Jsou známy negativní prognostické faktory, mezi něž patří zvýšený proliferační index, přítomnost dalších chromozomálních změn mimo obligátní t(14;18), mužské pohlaví, přítomnost B příznaků, zvýšená laktátdehydrogenáza (LD), předchozí léčba cytostatiky, aj. (Adam, Vorlíček *et al.*, 2001). Dosavadní publikované výsledky ukazují, že nejlepší prognózu mají pacienti ve stagingu I nebo II. Po radioterapii je 40-50% pacientů v bezpříznakové fázi i po 10 letech. Přesto u 50% pacientů je možné nalézt nádorové buňky standardními metodami PCR. Pacienti ve stagingu III nebo IV často dosáhnout kompletní remise po chemoterapii, ale doba trvání je krátká a recidivy jsou běžné. Přičemž se šance na delší období remise zvyšuje, pokud ke kompletní remisi dojde v brzké době po zahájení léčby (Schüler, Dölken, 2005).

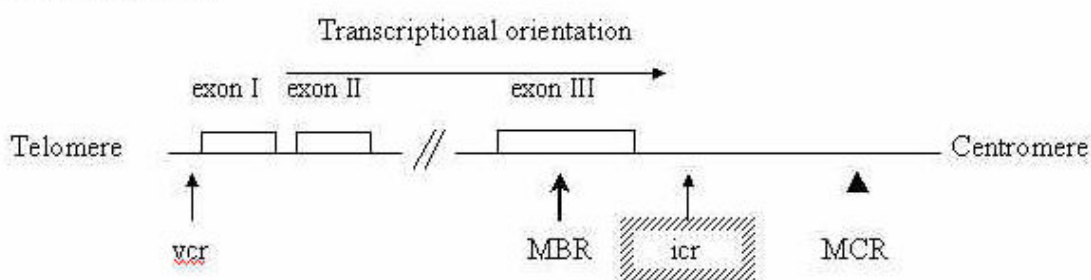
Několik prací (*Garvin et al.*, 1983, *Horning a Resenberg* 1984, *Johnoson et al* 1995, *Yuen et al.* 1995,) si podrobně všímalo přirozeného průběhu onemocnění. Zjistilo se, že u některých nemocných může docházet ke spontánním remisím, na druhé straně dochází k transformaci do jiných typů lymfomů. Transformace je spojena s dalšími genetickými změnami původního lymfomu a vzniká se stejnou frekvencí u léčených i neléčených případů. Medián přežití po transformaci byl různý v několika studiích, maximálně však 22 měsíců. Spontánní regrese byly pozorovány u pacientů s minimální nebo střední adenopatií. Regrese nevylučovala opětovnou progresi. Zhruba u 60% případů je nutné zahájit terapii zhruba po 3 letech. Nemocní kteří dosáhnou kompletní remise přežívají s mediánem 81 měsíců (Mayer, 2001).

## 2 Translokace t(14;18)

Translokace t(14;18) se nachází u více jak 90% pacientů s FL a asi u 20% pacientů s DLBCL. Pro svoji četnost výskytu poskytuje ideální cíl nejen pro diagnostiku onemocnění, ale i pro molekulární sledování minimální reziduální nemoci (MRN) (viz. 4) (van Dongen *et al.*, 2003).

Při translokaci se k sobě dostane gen protoonkogenu BCL-2 v oblasti chromozomu 18q21 a genový lokus IgH na chromozomu 14q32 (Cottliar *et al.*, 2006). Konec 18. chromozomu se připojí na 14. chromozom do oblasti J pro těžký řetězec. Aberantní 14. chromozom se označuje jako 14q+. Na recipročním 18q- chromozomu se objevuje konec 14. chromozomu se zbývajících oblastmi pro těžký řetězec, V a D. Tato translokace má zásadní vliv na expresi proteinu Bcl-2 (Mayer, 2001). Nadměrná exprese proteinu Bcl-2 zabraňuje vstupu buňky do apoptózy, normálně přítomné v zárodečných centrech folikulů. Zdravá B a T buňka prezentuje na vnější membráně mitochondrií nízkou hladinu proteinu Bcl-2 (Jaffe *et al.*, 2001).

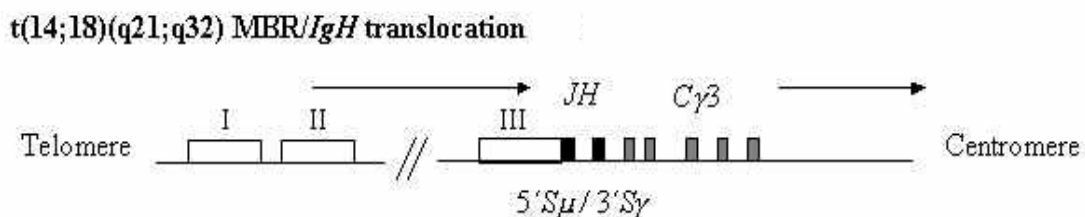
### Germline *BCL-2*



**Obrázek č. 1** Stavba genu *BCL-2* (Vega *et al.*, 2002)

Na molekulární úrovni je struktura t(14;18) dobře prozkoumána. Gen BCL-2 má 3 exony. Jen druhý exon a část 5' konce třetího exonu podléhají translaci. Na 14. chromozomu dochází ke zlomům v oblasti J genu pro těžké řetězce. Na úseku chromozomu 18q21 dochází ke zlomům nejčastěji ve 2 oblastech (viz. obr. č. 1) (Mayer, 2001).

1. Přibližně v 70% se vyskytuje zlom v major break region (MBR), který je lokalizován v oblasti 3' konce třetího exonu (viz. obr. č. 2).
2. Asi v 9% dochází ke zlomu v minor cluster region (mcr), který je lokalizován 20kb pod genem Bcl-2 (Schraders *et al.*, 2005).



**Obrázek č. 2** Translokace t(14;18) zahrnující oblast BCL-2 MBR s genem 3' UTP a JH úseky IgH (Vega et al., 2002).

Molekulární technika PCR neumí detekovat zlomy mimo oblast MBR a mcr regionů, díky obrovské vzdálenosti zlomů na obou chromozomech. Alternativu a tím zlepšení diagnostiky FL nabízí long-distance PCR, která detekuje translokaci IgH/BCL-2 v dalších 30 kb pod oblastí MBR genu BCL-2. Další variantou je použití techniky fluorescenční hybridizace in situ (FISH), která umí detekovat zlomy mimo oblast MBR a mcr regionů, její nevýhodou však je nutnost použití čerstvé tkáně (Jiang, 2002).

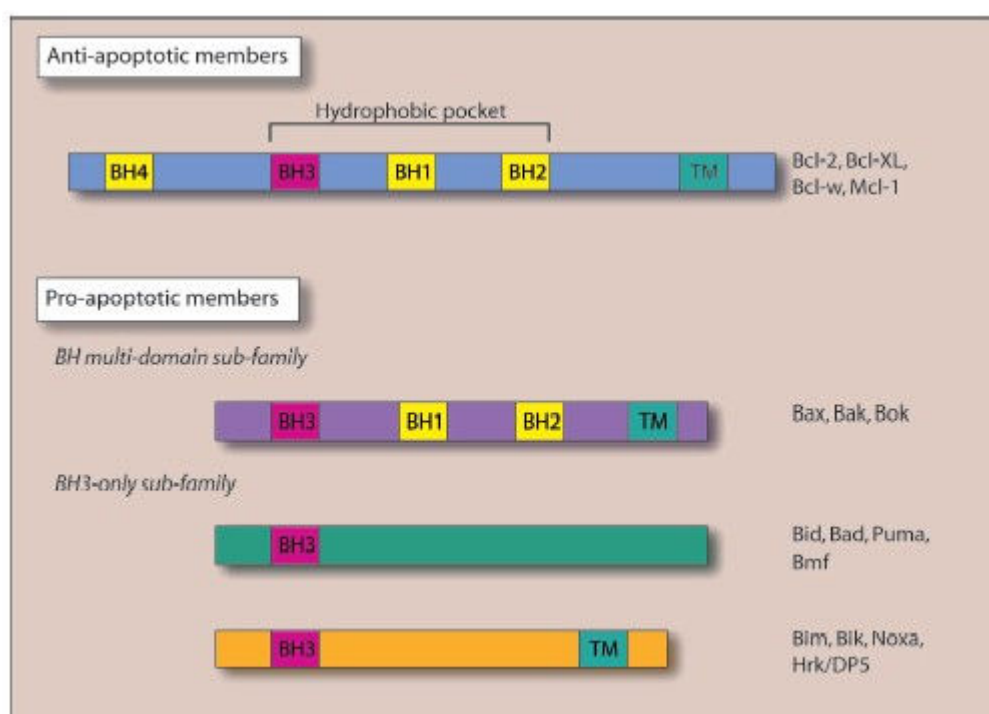
## 2.1 Role genu BCL-2 v apoptóze

Růst nádorových buněk je podmíněn nejen nekontrolovaným buněčným dělením, ale také snížením jejich opotřebovatelnosti a naopak zvýšenou schopností přežít. Většina nádorových buněk získala rezistenci vůči mechanismům vedoucím k jejich programovanému zániku – apoptóze. Existují experimentální důkazy, že narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a rozvoje nádorových buněk. Velmi důležitou úlohu přitom má onkogenní potenciál faktorů proteinové rodiny Bcl2 (Rejtar et al., 2002).

### 2.1.1 Proteinová rodina Bcl-2

Rodina Bcl-2 proteinů je rozsáhlá skupina víceúčelových proteinů, které mají vliv na buněčnou smrt, především na apoptózu, ale také na buněčný cyklus, transkripční represi p53 a glukózovou homeostázu (Patingre, Levine, 2006). Zřejmě nejvíce zkoumaným genem z této skupiny je gen BCL-2 a jeho produkt protein Bcl-2. Jedná se o první nalezený savčí gen analogický ke genu ced-9 bakterie *C. elegans*. V celé skupině proteinů je možné najít bílkoviny s různou sekvencí aminokyselin v polypeptidovém řetězci, ale lze najít i sekvenčně konzervované oblasti, tzv. BH1, BH2, BH3 a BH4 domény (viz. obr. č 3). Tato rodina zahrnuje proteiny potlačující proces apoptózy, například Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1 a Bcl-w a proteiny pro-apoptózy, například Bax, Bak, Bcl-xS, Bok. Oba typy proteinů spolu tvoří homodimery a heterodimery, jež regulují proces apoptózy. Studie genu BCL-2 signalizují, že

konzervované domény jsou nutné pro interakci s proapoptózovými členy a pro inhibici vůči apoptóze. Předpokládá se, že doména BH3 je rozhodujícím faktorem (Kim *et al.*, 2004). Nerovnováha v poměru antiapoptických a proapoptických proteinů rodin Bcl-2, které vychylují rovnováhu směrem přežívání, může učinit nádorové buňky více rezistentní k celé řadě stimulů vyvolávajících buněčnou smrt, mezi ně lze zařadit všechna chemoterapeutika, záření, hypoxii, antionkogen p53 a další (Masopust, 2003). V nádorových buňkách s nadměrnou expresí proteinu Bcl-2 dochází ke zvýšené rezistenci těchto buněk k apoptóze indukované protinádorovými léky, což vedlo k označení Bcl-2 za „multidrug resistance protein“ (MDR protein) (Cottliar *et al.*, 2006; Masopust, 2003). Příkladem může být situace, kdy protein Bcl-2 také blokuje pro-apoptózovou aktivitu proteinů Bax a Bak, která je aktivovaná apoptickými signály protinádorových léků (Kim *et al.*, 2004).



**Obrázek č. 3** Konzervované domény proteinové rodiny Bcl-2 (Bras *et al.*, 2004)

### 2.1.2 Role genu BCL-2 a proteinu Bcl-2 u FL

Při translokaci t(14;18) je u proteinu Bcl-2 zvýšená exprese, ale struktura proteinu je normální, protože zlomové místo je lokalizováno vně kódujícího segmentu genu BCL-2. Normálně je produkt genu BCL-2 exprimován v dílčích krocích přestavby B-buněk. Zvýšená exprese proteinu Bcl-2 je zjištěna v 90% případů FL grade I, II, IIIa (Schraders *et al.*, 2005).

Protein Bcl-2, na rozdíl od jiných MDR proteinů, nebrání vstupu a akumulaci chemoterapeutik v nádorové buňce. Protein Bcl-2 neodstraňuje počáteční poškození vyvolané lékem ani nemění poměr reparace poškození, ale brání tomu, aby vyvolané poškození bylo převedeno na buněčnou smrt (Masopust, 2003). Nádorové buňky, které exprimují vysokou hladinu proteinu Bcl-2, stále vykazují inhibiční účinek protinádorových léků na buněčný cyklus. To znamená, že je například zpomalena syntéza DNA nebo je ovlivněna tvorba mikrotubulů během mitózy, buňky zůstávají životaschopné po delší období, což má za následek zvýšené přežívání (Schüler, Dölken, 2005; Masopust, 2003). Z tohoto důvodu není chemoterapeutická léčba FL příliš účinná (Mayer, 2001).



## 3 Klonalita B-lymfocytů

### 3.1 Buňky imunitního systému

Podstatnou část imunitního systému tvoří různé druhy leukocytů. Všechny pocházejí z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně. Kmenové buňky se ve dření udržují po celý život. Pod vlivem různých faktorů se jich část diferencuje na různé subtypy leukocytů a jejich úbytek se kompenzuje dělením kmenových buněk. Z myeloidní linie vznikají monocyty, granulocyty a další druhy buněk, které tvoří základ nespecifické imunity. Z lymfoidní linie se diferencují buňky NK (natural kill cell), B a T lymfocyty. Vývoj B-lymfocytů probíhá v kostní dření a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech. Konečným diferenciačním stádiem jsou plazmatické buňky. Hlavní část vývoje T-lymfocytů probíhá v thymu, zde vznikají dvě fenotypicky odlišné subpopulace; prekurzory pomocných T buněk a prekurzory cytotoxických T buněk. T i B lymfocyty procházejí během diferenciací stádií, v nichž dochází k náhodnému přeskupování genů kódujících variabilní úseky jejich antigenně specifických receptorů (viz 4.4) (Hořejší, Bartůňková, 2001).

### 3.2 Receptor B lymfocytů

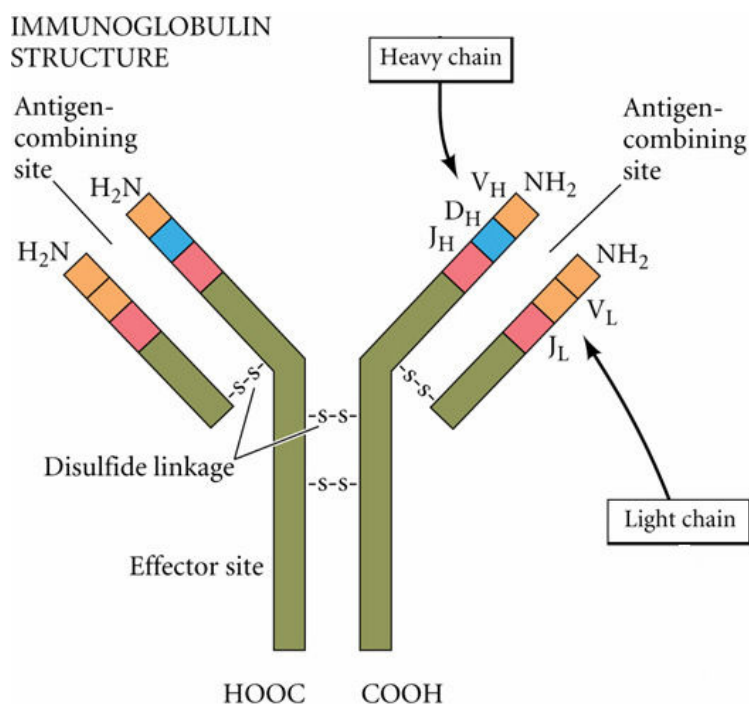
Komplex receptorů zralých B lymfocytů (BCR) se skládá z vlastního membránového imunoglobulinu, tvořeného ze dvou těžkých imunoglobulinových řetězců (IgH) a dvou lehkých imunoglobulinových řetězců (IgL), a krátkých asociovaných signalizačních molekul připojených disulfidickými můstky (Matsuuchi, Gold, 2001). IgH jsou transmembránové proteiny, v C-terminální části mají úsek 20 hydrofobních aminokyselin, kterými jsou ukotveny v membráně (Hořejší, Bartůňková, 2001). S komplexem BCR jsou asociovány dva transmembránové proteiny zvané  $Ig\alpha$  a  $Ig\beta$ , které mohou být nekovalentně spojeny s cytoplazmatickými protein tyroxin-kinázami (PTK). Membránové Ig patří nejčastěji k třídám IgM a IgD a po setkání s antigenem se mohou změnit v izotypy IgA, IgG a IgE (Vinuesa, Cook, 2001).

Komplex BCR a jeho analogie během diferenciací jsou podstatné při vývoji B buněk (Matsuuchi, Gold, 2001).

### 3.3 Struktura imunoglobulinu

Typickými strukturní rysy Ig jsou dva IgH spojené disulfidickými můstky. Ke každému IgH řetězci je disulfidickým můstkem připojen jeden IgL. IgH se skládá ze čtyř

strukturně podobných domén, každá je tvořena sekvencí 110-120 aminokyselin. Jednotlivé domény jsou spojeny krátkými spojovacími úseky polypeptidového řetězce, který je stabilizován disulfidickým můstkem. IgL se skládá ze dvou imunoglobulinových domén. Domény na N-konci IgH a IgL jsou variabilní, značíme je  $V_H$  a  $V_L$ . Ostatní domény jsou konstantní, tedy shodné u řetězců téhož typu. Konstantní domény IgL se označují  $C_L$ , u IgH jsou označovány  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ , číslování jde od N-konce k C-konci (viz. obr. č. 4).



**Obrázek č. 4** *Struktura imunoglobulinového řetězce (Gilbert, 2006)*

Ig $\lambda$  a Ig $\kappa$  se liší primární strukturou koncových domén a jsou kódovány odlišnými geny. Velikost a všeobecné strukturní a funkční vlastnosti obou typů řetězců jsou si velmi podobné.

Genové úseky kódující konstantní části různých tříd IgH jsou uspořádány tandemově na 14. chromozomu. U řetězců  $\gamma$  existují čtyři významně odlišné subtypy a u řetězců  $\alpha$  dva subtypy. Imunoglobuliny tvořené těmito různými typy IgH se nazývají IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Jak již bylo uvedeno, monomerní IgM a IgD se nachází na povrchu B buněk a tvoří BCR komplex (Hořejší, Bartůňková, 2001).

### 3.4 Přestavba B lymfocytů

Gen kódující řetězce imunoglobulinů se skládají z většího počtu několika typů genových segmentů, které při vývoji lymfocytů podléhají procesu zvanému přeskupování.

Geny kódující IgH se nacházejí v genovém komplexu na 14. chromosomu (Hořejší, Bartůňková, 2001). Tento komplex obsahuje na 5'konci skupinu 46-52 funkčních sekvenčně podobných úseků V (variabilita), rozdělených na základě homologie do 6-7 rodin. Dále následuje skupina 27 úseků D (diversita), pak skupina 6 krátkých úseků J (joining) a na 3'konci jsou uspořádány genové segmenty kódující konstantní části těžkého řetězce (C), jejichž použitím jsou definovány jednotlivé třídy imunoglobulinů (Mastuda *et al.*, 1998). V-D-J přestavba je zprostředkována enzymovým komplexem, ve kterém proteiny RAG1 a RAG2 (recombination activating gene) hrají klíčovou roli v rozpoznání a sestřihu DNA v rekombinačních signálních sekvencích (recombination signal sequences, RSS), které jsou umístěny po stranách jednotlivých V, D, J genových segmentů (van Dongen *et al.*, 2003).

Struktura genových komplexů kódujících Ig $\lambda$  a Ig $\kappa$  je podobná, ale jednodušší, neobsahují segmenty D a skládají se z menšího počtu úseků V aj. Existuje pouze jeden segment kódující konstantní část řetězce  $\kappa$ , ale několik segmentů kódujících velmi podobné subtypy konstantních částí řetězce  $\lambda$ . Tyto varianty Ig $\lambda$  jsou funkčně ekvivalentní a nemají žádný praktický význam (Hořejší, Bartůňková, 2001).

### 3.4.1 Proces rekombinace B lymfocytů

V progenitorech B lymfocytů (pro-B) dochází nejprve k vyštěpení úseku IgH genového komplexu mezi náhodným D segmentem a některým J segmentem (D-J přeskupení). D-J přeskupování může probíhat i opakovaně, dokud jsou k dispozici nevyštěpené D a J segmenty. Tento děj probíhá paralelně na obou chromosomech.

Poté následuje vyštěpování rozsáhlého úseku mezi některým V segmentem a DJ segmentem vzniklým v předchozím kroku (V-D přeskupení). Pokud je přeskupení V-D-J úspěšné (lze číst ve správné fázi), takže z odpovídající mRNA může vzniknout kompletní H polypeptid, je další přeskupování na druhém chromosomu zastaveno. Tudíž každý B lymfocyt produkuje jen jeden IgH řetězec. Totéž se později stane i s geny pro L řetězec. Tento jev se nazývá alelická exkluze.

Po přepisu přeskupeného IgH genu do mRNA dochází sestřihu primárního transkriptu, kterým se odstraní části vzniklé přepisem intronů. Nejprve dochází k tvorbě H řetězců  $\mu$ , protože  $C_\mu$  segment leží nejbližší VDJ segmentu. V okamžiku, kdy buňka úspěšně prošla přeskupováním IgH genů a prokázala to tvorbou  $\mu$  řetězců, stává se z ní pre-B lymfocyt.

Řetězec  $\mu$  syntetizovaný v pre-B lymfocytu se nemůže asociovat s L-řetězcem, protože ještě nedošlo k přeskupení jejich genů. Místo L-řetězců však pre-B buňky syntetizují náhradní L-řetězec ( $\psi$ L), které se skládají ze dvou malých proteinů, produktů zvaných

VpreB  $\lambda 5$ . Komplex membránového H ( $\mu$ ) řetězce s  $\psi L$  asociovaným dimerovým komplexem signalizačních proteinů Ig $\alpha$ -Ig $\beta$  se objevuje na povrchu pre-B buňky a jeho povrchová exprese rozhoduje o dalším osudu buňky. Tento pre-B receptor se pravděpodobně váže na nějaký dosud neidentifikovaný ligand a tato interakce poskytuje buňce pozitivní signál k dalšímu vývoji, zahájení přeskupování genů pro L-řetězec.

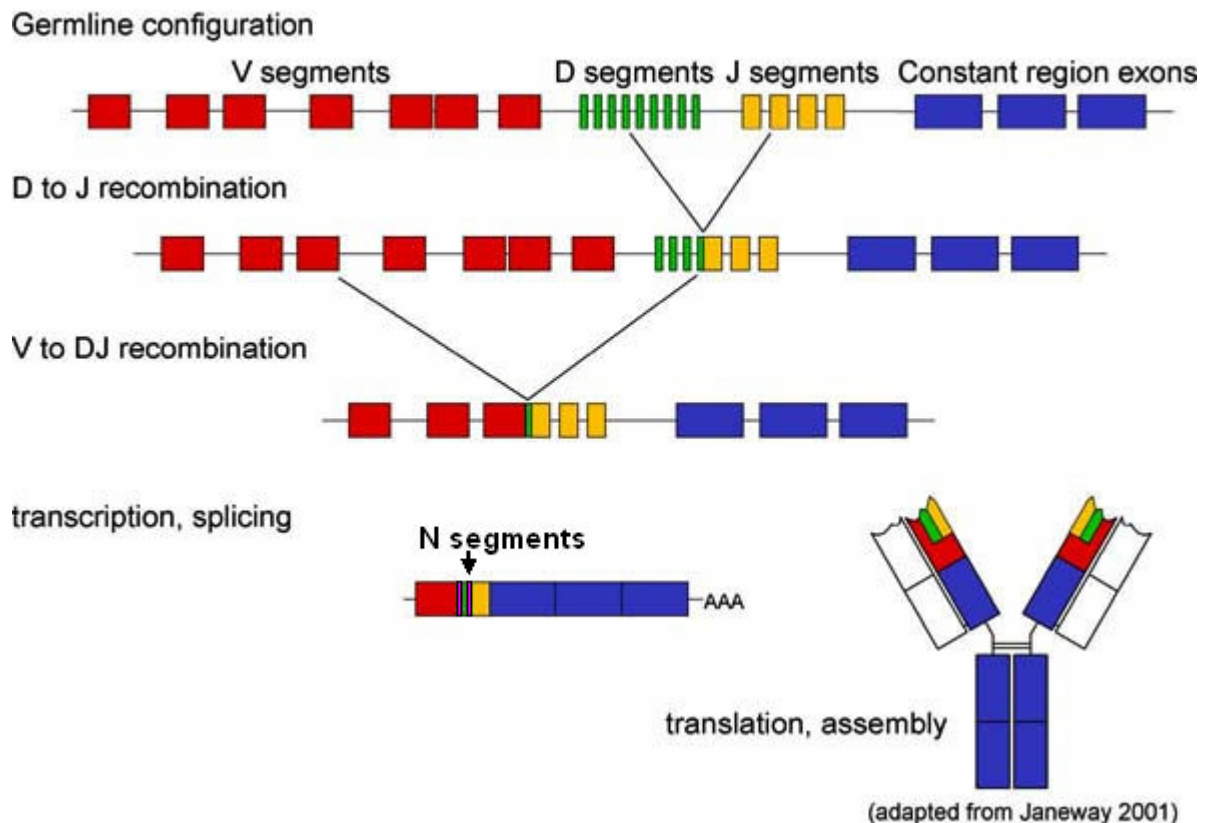
Nejprve začne přeskupování genů kódujících L řetězec  $\kappa$ , vyštěpují se opakovaně velké úseky DNA mezi některým V segmentem a některým J segmentem, opět souběžně na obou chromosomech, dokud není některý pokus úspěšný, tedy dokud nevede k produktu čtenému ve správné fázi a poskytujícímu funkční L-řetězec schopný s IgH ( $\mu$ ) řetězcem vytvořit kompletní povrchový IgM, který by nahradil pre-B receptor. Při úspěšném přeskupení opět dochází k alelické exkluzi.

Není-li přeskupení  $\kappa$  genů na žádném z obou chromosomů úspěšné, zahájí se obdobně přeskupování genů  $\lambda$ . Není-li ani toto úspěšné, pre-B lymfocyt hyne. Expresí povrchového IgM se buňka stává nezralým B lymfocytem. Ne všechny H a L řetězce mohou spolu vytvářet stabilní dimery. V případech, kdy v důsledku nekompatibility H a L řetězců nemůže vzniknout stabilní povrchový Ig, daná B buňka hyne.

V dalším vývojovém stádiu dochází k současné expresi povrchového IgM a IgD, čímž se z buňky stává zralý B lymfocyt. Individuální variabilita molekul Ig na povrchu zralých B lymfocytů je tedy dána hlavně růzností V(D)J genových segmentů. Druhým mechanismem výrazně zvyšujícím počet různých výsledných struktur variabilních domén je spojovací variabilita. Po vyštěpení genových úseků během DJ a V (DJ) přeskupení nejsou zbývající konce odštěpeny zcela přesně definovaným způsobem a jejich spojením tedy mohou vznikat nové varianty. Kromě toho působením enzymu terminální transferázy dochází k náhodnému vkládání N-úseků mezi rekombinující se segmenty, což opět zvyšuje variabilitu (viz. obr. č. 5) (Hořejší, Bartůňková, 2001).

Pokud dojde ke styku zralého B lymfocytu s antigenem, dojde k iniciaci somatických mutací ve V segmentu pro geny IgH a IgL (Macintyre *et al.*, 2000), což vede k dalšímu vzrůstu počtu variant. Navíc se ukazuje, že v této fázi může dojít k reaktivaci rekombinačních mechanismů a k pokusům vytvořit nové antigenně specifické BCR opětným přeskupováním genových úseků kódujících variabilní části imunoglobulinových řetězců (Hořejší, Bartůňková, 2001).

## V(D)J Recombination



Obrázek č. 5 *V-(D)-J rekombinace (upraveno dle Inlay, 2002)*

### 3.4.2 Proces rekombinace T lymfocytů

Molekuly receptorů T lymfocytů (TCR) se skládají ze dvou těžkých řetězců, které jsou spojeny disulfidickým můstkem. Přeskupování TCR genů probíhá podobně jako přestavby Ig a je při něm používán stejný komplex enzymů (Davis, Bjorkman, 1988).

Výše popsaným způsobem vzniká pro každou lymfoidní buňku unikátní nukleotidová sekvence, která může být využita pro detekci transformovaných buněk klonálních lymfomů. Díky tomu lze určit specifickou přestavbu pro každého pacienta, která je využita v následujících stádiích léčby ke sledování MRN (Pui *et al.*, 2004; van der Velden 2003).

## 4 Minimální reziduální nemoc

Stav kdy v průběhu terapie již nejsou maligní buňky detekovatelné běžnými cytologickými metodami označujeme MRN. Hovoříme o kompletní klinické remisi. V těle pacienta se však teoreticky může nacházet až  $10^{10}$  maligních elementů (Campana, Chui, 1995).

Několik studií ukázalo, že kvantitativní detekce MRN u lymfoidních nádorů předpovídá klinický průběh onemocnění. Monitorování léčebné odpovědi je rozhodující pro ohodnocení rizika relapsu a upřesňuje intenzitu používané terapie pro daného pacienta (Zehentner *et al.*, 2006). Přestože výsledky léčebných protokolů u lymfomů zatím nejsou k dispozici, je zřejmé, že sledování MRN bude v budoucnu důležitým klinickým fenoménem. Kromě NHL má detekce MRN prognostický význam i u dalších hematologických malignit jako například u akutní lymfoblastické leukémie a akutní myeloidní leukémie, chronické myeloidní leukémie či mnohočetného myelomu.

MRN může být detekována kvalitativně i kvantitativně. Ačkoliv kvalitativní stanovení může být velice významné, poskytuje omezenou informaci a neumožňuje preciznější analýzu kinetiky maligního klonu. Naproti tomu kvantitativní stanovení MRN umožňuje získat informaci přímo o množství maligních buněk. Pro detekci kvantitativní MRN se používají tři různé techniky: průtoková cytometrie (FC – flow cytometry), PCR technika založená na detekci změn na úrovni DNA případně mRNA (van der Velden *et al.*, 2003).

Několik studií porovnávalo citlivost detekce MRN metodou FC a molekulárně genetických metod. FC je základní imunologická metoda, která poskytuje rychlou a citlivou metodu na odhalování až 1 leukemické buňky v  $10^3$  -  $10^4$  zdravých buněk, nevýhodou však je nutnost použití čerstvé tkáně. Pacient-specifické RQ-PCR mohou být pro přestavby genů Ig/TCR limitovány detekcí 1 nádorové buňky v  $10^4$  –  $10^5$  zdravých buněk (Zehentner *et al.*, 2006).

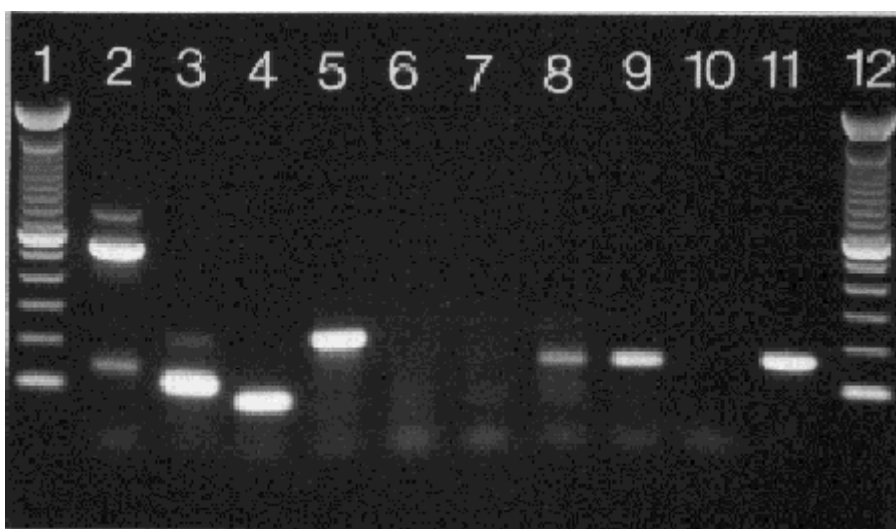
### 4.1 Kvantitativní detekce MRN

Pomocí PCR v reálném čase (RQ-PCR – real-time quantitative PCR) lze získat kvantitativní data analýzou genových přestaveb Ig/TCR, fúzních zlomových míst chromozomálních aberací, transkriptů fúzních genů, aberantních genů, nebo aberantně exprimovaných genů. Výběr těchto molekulárních cílů závisí na typu daného onemocnění (van der Velden *et al.*, 2003). Detekce klonálně specifických přestaveb genů Ig/TCR na DNA úrovni se často používají jako cíle ve studiích MRN u leukémií a lymfomů. Tyto

přestavby jsou považovány za "fingerprints", protože každý klon má své vlastní delece a náhodně vložené nukleotidy v místě spojení V-(D)-J segmentů (Zehentner *et al.*, 2006). Při této metodě se využívá RQ-PCR a pacient-specifické sekvenování genových přestaveb, které dovoluje vyvinutí léčebné strategie pro každého pacienta (Schüler, Dölken, 2005).

## 4.2 MRN-FL

Až na několik vzácných případů, patří FL k neléčitelné nemoci (Rambaldi *et al.*, 2005). V průběhu nemoci dochází střídavě k remisím a relapsům onemocnění. Tyto recidivy jsou způsobené zbylými nádorovými buňkami, které jsou detekovatelné pouze velmi citlivými metodami (Tysarowski *et al.*, 2007). Pro detekci MRN má význam zejména sledování specifických translokací t(14;18) přítomných u FL (viz. obr. č. 6), což je podmíněno vysokou citlivostí PCR a RT-PCR (Krsková *et al.*, 2004). Druhým nezávislým cílem pro sledování MRN u lymfomů je detekce klonálně specifických přestaveb genů Ig/TCR (Tysarowski *et al.*, 2007).



**Obrázek č. 6** Přestavba *bcl 2/IgH* PCR v kostní dřeni u pacientů s FL. Přestavba je patrná u vzorku č. 2, 3, 4, 5, 8 a 9., vzorek č. 11 je pozitivní kontrola, vzorky 1 a 11 jsou velikostní marker. Proměnná velikost jednotlivých bandů ilustruje různorodá zlomová místa u pacientů ([http://www.hmds.org.uk/insets/fcl\\_6.html](http://www.hmds.org.uk/insets/fcl_6.html)).

Diskutovaným problémem je použití odlišných technik detekce MRN stejně jako prognostický a klinický význam detekce MRN po radioterapii, chemoterapii a terapii monoklonálními protilátkami. Komplikovaná je i srovnatelnost různých studií sledování

MRN u pacientů s FL, jelikož dosud nebyly sjednoceny používané techniky PCR (Hirt *et al.*, 2003). Při použití nested-PCR, obvykle užívané pro detekci t(14;18) není možné odhadnout počet nádorových buněk. To ovšem umožňuje RQ-PCR, proto je pro sledování MRN při různých léčebných protokolech vhodnější technikou. Ve studii Summerse *et al.*, (2002) je navrženo sledování MRN v periferní krvi a kostní dřeni právě metodou RQ-PCR. Vzorky kostní dřene mají lepší výpovědní hodnotu, jelikož zde dochází k vyšší infiltraci lymfoidních buněk (Rimbaldi, 2005; Gribben *et al.*, 1994).

Při kvalitativním sledování MRN pomocí kvalitativní PCR je možné nalézt tři obrazy: přetrvávající negativitu, občasnou negativitu a občasnou pozitivitu, a přetrvávající pozitivitu (Mayer, 2001).

U nově diagnostikovaných pacientů, kteří dosáhli během prvního roku léčby molekulární remise, bylo dosaženo signifikantně delšího přežívání bez známek progresu. Nejlepší prognózu mají nemocní, kteří v průběhu léčby nejen dosáhnou molekulární remise, ale také v ní dlouhodobě setrvávají (López-Guillermo *et al.*, 1998; Mayer, 2001). Zdá se zřejmé, že přetrvávající PCR pozitivita nebo její vznik s narůstající tendencí má negativní vliv na osud nemocných. Otázkou zůstává, jak na tento stav terapeuticky reagovat. Kvantitativní sledování nádorových buněk pomocí RQ-PCR je také ve stádiu klinických studií (Mayer, 2001). Publikované studie ukazují, že sledování MRN pomocí RQ-PCR je vhodné pro detekci kinetiky nemoci. Výsledky získané kvantitativním monitorováním MRN mohou předpovídat bezprostředně hrozící relaps nebo pokračující kompletní remisi při krátkodobém i dlouhodobém sledování pacientů s FL (Schüler, Dölken, 2005).



## Molekulární metody

Diagnostika NHL vyžaduje zapojení řady metod, morfologické metody zůstávají sice nadále hlavním diagnostickým přístupem, nicméně imunohistochemické a molekulární metody se zařazením FISH se staly nezbytnou součástí diagnostiky a přesné klasifikace jednotlivých lymfomů. Molekulární metody mají v primární diagnostice maligních lymfomů dvě základní využití, slouží k detekci klonálních abnormalit v případě diferenciální diagnózy mezi reaktivní a nádorovou proliferací, a dále lze identifikovat genetické změny, jakými jsou například nádorově specifické chromozomální translokace. Jejich detekce přináší užitek v subklasifikaci lymfomů. Mezi základní metody molekulární diagnostiky patří polymerázová řetězová reakce (PCR), která nahradila Southernovu hybridizaci. Amplifikace genomové DNA může jako vstupní materiál využít DNA izolovanou z nativní či zmražené tkáně, ale i DNA získanou z tkáně zalité do parafrínových bločků. Z parafrínových bločků lze v malém procentu případů izolovat kvalitní RNA vhodnou i pro RT-PCR.

Kromě základní diagnostiky lymfomů se molekulární metody osvědčují i ve sledování úspěšnosti terapie a ve sledování MRN. Pro detekci MRN má význam zejména sledování specifických translokací přítomných v původním nádoru, což je podmíněno vysokou citlivostí PCR a RT-PCR (Křsková *et al.*, 2004). Druhým nezávislým cílem pro sledování MRN u lymfomů je detekce klonálně specifických přestaveb genů Ig/TCR.

V naší laboratoři jsou zavedeny standardizované mezinárodní protokoly BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936, které mají za cíl standardizovat postupy pro detekci přestaveb Ig/TCR a chromozomové aberace t(11;14) a t(14;18) (van Dongen *et al.*, 2003).

## 5 Roztoky a chemikálie pro purifikaci a separaci nukleových kyselin

### 5.1 Roztoky pro izolaci buněk

10x koncentrovaný lyzační roztok pro erytrocyty:

1,55M  $\text{NH}_4\text{Cl}$

0,1M  $\text{HN}_4\text{CO}_3$

(skladovaný při 4°C, před upotřebením naředěný na 1x koncentrovaný roztok)

PBS roztok:

137mM NaCl

2,7mM KCl

4,3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$

1,4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

pH 7,4

sterilizován autoklávováním

### 5.2 Roztoky pro izolaci RNA

Trizol

chloroform

isopropanol

75% ethanolu

xylén

Kit na izolaci RNA z parafinových bločků (High Pure RNA Preparation Kit, Roche)

### 5.3 Roztoky pro izolaci DNA

chloroform

100% ethanol

0,1 M Sodium citrate

75% ethanol

Trizol

Kit na izolaci DNA z parafinových bločků (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche)

## **5.4 Roztoky pro elektroforézu**

### **5.4.1 Polyakrylamidový gel:**

TEMED (tetramethyldiamin)

APS (amoniumpersulfát)

akrylamid:bisakrylamid (29:1)

10x TBE :

0,9M Tris-borat

5g kyselina boritá

0,01M EDTA

pH = 8,0

### **5.4.2 Agarózový gel:**

Agaróza

Ethidium Bromid

10x TBE

## 6 Purifikace a separace nukleových kyselin

První fází je extrakce DNA nebo RNA z tkáně zmražené nebo zalité v parafinových bločcích případně izolace buněk z periferní krve a kostní dřeně s následnou extrakcí nukleových kyselin.

### 6.1 Lyze buněk a tkání

V laboratoři používáme při izolaci buněk z periferní krve a kostní dřeně osmotickou lyzu. Vzorek kostní dřeně nebo periferní krve v protisrážlivém činidle (EDTA) přelijeme do zkumavky. Vzorek 5x zředíme v 1x koncentrovaném lyzačním roztoku a necháme lyzovat za občasného promíchání v chladu po dobu 30-40 minut. Poté vzorek centrifugujeme po dobu 20 minut při 2 200 otáčkách za minutu a teplotě 4°C. Supernatant následně odstraníme, zbytky lyzačního roztoku odsajeme pipetou se špičkou s filtrem. Vzorek resuspendujeme v 5 000 µl 1x koncentrovaného lyzačního roztoku. Centrifugujeme 10 minut při 2 200 otáčkách a teplotě 4°C. Vzorek slijeme, odstraníme zbylý roztok, resuspendujeme v 5 000 µl PBS. Opět centrifugujeme za stejných podmínek. Peletu resuspendujeme v 1000 µl PBS, vzorek přepipetujeme do řádně označených 1,5 ml zkumavek, centrifugujeme za stejných podmínek. Peletu buněk uchováváme v -80°C.

### 6.2 Izolace nukleových kyselin z tkáně zalité v parafinovém bloku

#### 6.2.1 Izolace geonomové DNA

U vzorku s nakrájenými parafinovými řezy (8-10 řezů 5µm silných) provedeme deparafinaci - přidáme 1 000 µl xylenu, protřepeme a vzorek centrifugujeme 2 minuty při 10 000 otáčkách při pokojové teplotě. Supernatant slijeme a opakujeme deparafinaci 2x.

Přidáme 1 000 µl chlazeného 100% ethanolu. Protřepeme a následně centrifugujeme 4 minuty při 10 000 otáčkách, slijeme supernatant. Opět přidáme 1 000 µl chlazeného ethanolu, protřepeme a centrifugujeme za stejných podmínek. Peletu vysušíme v termostatu při 37°C pod dobu 10 minut.

Pokračujeme dle návodu výrobce v „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (ROCHE).

### **6.2.2 Izolace RNA**

Ke vzorku s nakrájenými parafinovými řezy (8-10 řezů 5µm silných) přidáme 800 µl xylenu, protřepeme a přidáme 400 µl nechlazeného 100% ethanolu. Následně vzorek centrifugujeme 2 minuty při 14 000 otáčkách při pokojové teplotě. Supernatant slijeme, přidáme 1 000 µl nechlazeného ethanolu, promícháme a centrifugujeme za stejných podmínek. Sušíme 10 minut při 55°C.

Dále pokračujeme dle návodu výrobce v „High Pure RNA Parafin Kit“ (ROCHE)

### **6.3 Izolace nukleových kyselin ze zmražené tkáně a jaderných buněk**

Výhodou metody izolace nukleových kyselin ze zmražené tkáně a z jaderných buněk s použitím Trizolu je možnost izolace RNA i DNA z 1 vzorku.

Ke vzorku zmražené tkáně (8-10 kryostatových řezů 5µm silných) nebo pelety buněk přidáme 1 000 µl Trizolu, resuspendujeme pipetou se špičkou s filtrem a vortexujeme, tak aby se tkáň nebo peleta buněk na dně zkumavky zcela uvolnila a rozpustila, necháme 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Přidáme 200 µl chloroformu, 10 sekund třepeme v ruce a 10 sekund vortexujeme. Vzorky inkubujeme 3 minuty při pokojové teplotě, následně centrifugujeme 15 minut při 11 600 otáčkách a teplotě 4°C. Následuje odběr vodné fáze na izolaci RNA a z mezifáze a spodní fáze pro izolaci DNA.

#### **6.3.1 Izolace RNA**

Po centrifugaci vzorku odebereme 4x 100µl horní vodné fáze, která obsahuje RNA. Přidáme 500 µl isopropanolu, promícháme převrácením a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě. Vzorek centrifugujeme 10 minut při 11 600 otáčkách a teplotě 4°C. Supernatant slijeme, přidáme 1 000 µl 75% ethanolu a promyjeme peletu. Centrifugujeme 5 minut při 9 200 otáčkách a teplotě 4°C. Supernatant slijeme a necháme peletu RNA zcela vysušit od zbytků ethanolu na sterilním filtračním papíru. Přidáme 40 µl vody pro injekce a necháme peletu rozpustit 10 minut při teplotě 55-60°C. Vzorek RNA uchováváme v -80°C.

#### **6.4 Izolace DNA**

Ze vzorku odebereme 500 µl interfáze a spodní fáze obsahující DNA a přidáme 500 µl 100% ethanolu, promícháme zkumavku otáčením a necháme 2–3 minuty precipitovat při pokojové teplotě. Centrifugujeme 5 minut při 5 500 otáčkách a teplotě 4°C. Slijeme

supernatant a peletu opláchneme 1 000  $\mu$ l 0,1 M Sodium citrate v 10% ethanolu, protřepeme v ruce a následně necháme 15–20 minut třepat při pokojové teplotě. Poté centrifugujeme 5 minut při 5 500 otáčkách a teplotě 4°C. Opakujeme opláchnutí pelety, po slití supernatantu necháme osušit na sterilizovaném filtračním papíru. Přidáme 1 000  $\mu$ l chlazeného 75% ethanolu, protřepeme a centrifugujeme 5 minut při 5 500 otáčkách a teplotě 4°C. Slijeme supernatant, osušíme peletu na filtračním papíru, přidáme 100  $\mu$ l vody pro injekce a inkubujeme 20 minut při 60°C. Vzorek uchováváme při -20°C.

## 7 Polymerázová řetězová reakce

### 7.1 *Nmyc/bglob*

Detekce integrity a kvantity izolované DNA ze zmražené tkáně a jaderných buněk.

#### Reakční podmínky

- 20µl cílového objemu
- 10x pufr+MgCl<sub>2</sub>
- 2mM dNTP
- Taq Purple(1U/uL)
- Primery: 8pmol/ul Nmyc1 a Nmyc2, 6pmol/ul bglob1 a bglob2

#### Amplifikační podmínky

- amplifikace 94°C 1:30 minut
- extense 55°C 2:00 minut
- 72°C 3:00 minut
- 72°C 7:00 minut
- chlazení 15°C ∞ minut
- počet cyklů 29 x

Výsledek PCR po vizualizaci na agarózovém gelu (viz 8.1): v případě kvalitní DNA amplifikace dvou PCR produktů: 280bp bglob a 480bp Nmyc.

### 7.2 *CTRL*

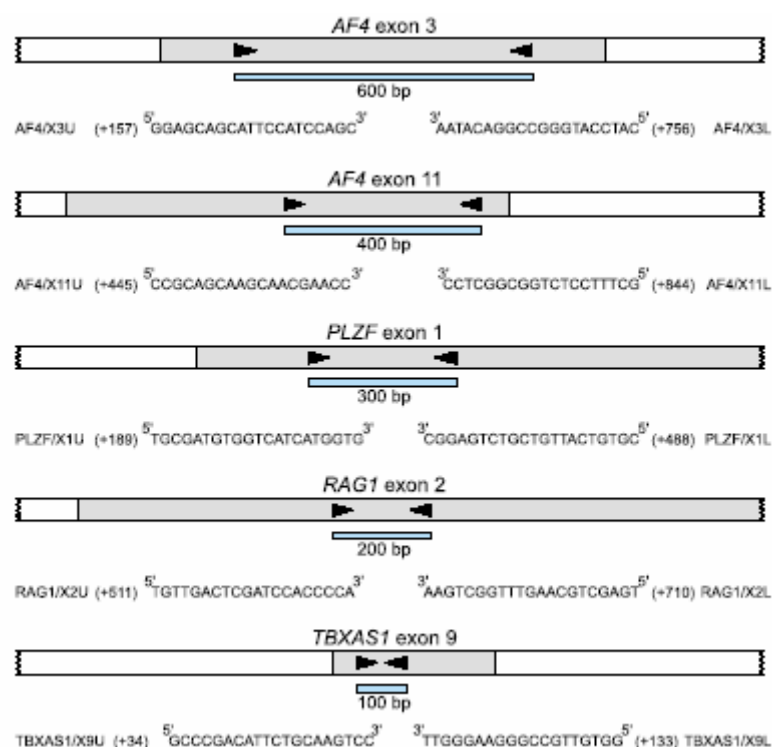
Detekce integrity a kvantity izolované DNA z tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu.

#### Reakční podmínky

- 50µl cílového objemu
- 10x pufr
- 2mM dNTP
- Taq Purple (1U/uL)
- 10pmol/ul od každého z použitých primerů: AF4ex3 S, AF4ex3 AS, AF4ex11 S, AF4ex11 AS, PLZFex1 S, PLZFex1 AS, RAG1ex2 S, RAG1ex2 AS, TBXAS1ex9 S, TBXAS1ex9 AS (viz. obr. č. 7)

### Amplifikační podmínky

- denaturace 94°C 2:00 minut
- amplifikace 94°C 0:45 minut
- extenze 60°C 0:45 minut
- 72°C 1:30 minut
- 72°C 10 :00 minut
- chlazení 15°C ∞ minut
- počet cyklů 35 x



**Obrázek č. 7** PCR detekce CTRL, schéma primerů pro amplifikaci PCR produktů kontrolních genů o velikosti 100bp , 200bp, 300bp, 400bp a 600bp (van Dongen et al., 2003).

Výsledek PCR po vizualizaci na agarózovém gelu (viz 8.1): v případě kvalitní a nefragmentované DNA amplifikace PCR produktů o velikostech: 100bp , 200bp, 300bp, 400bp a 600bp.

Vyšetření těchto kontrolních genů provádíme u tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu neboť fixace v kyselém formolu při nevhodných podmínkách způsobuje fragmentaci nukleových kyselin.



### 7.3 Detekce IgH, IgK klonality

#### Reakční podmínky

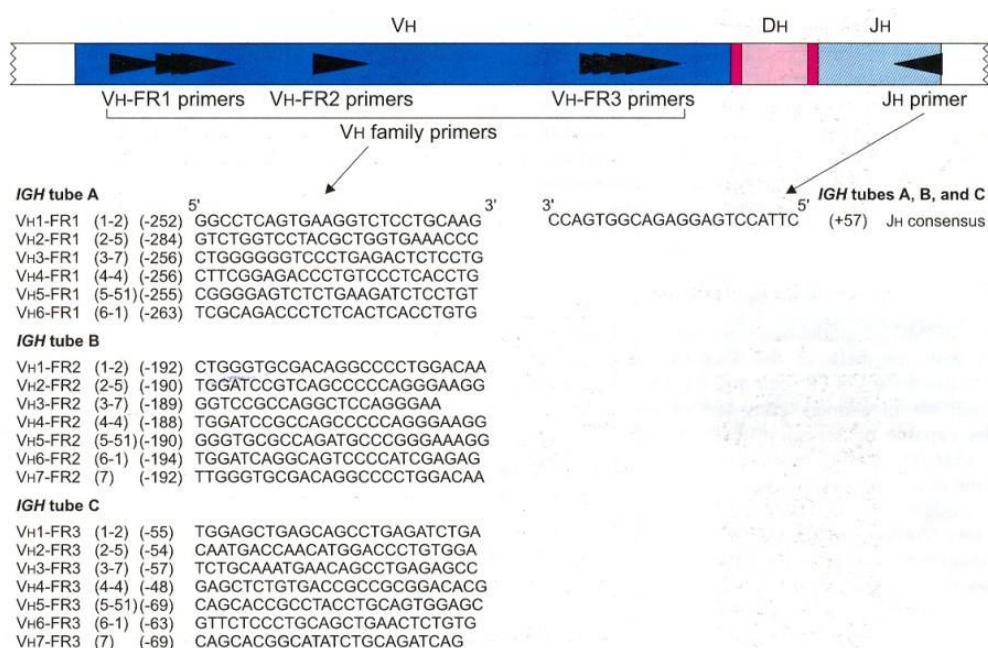
- 42µl cílového objemu
- 10x pufr
- 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 2mM dNTP
- Taq Gold (5U/uL)
- 10pmol/ µl od každého z použitých primerů (viz obr. č. 8, 9)

#### Amplifikační podmínky

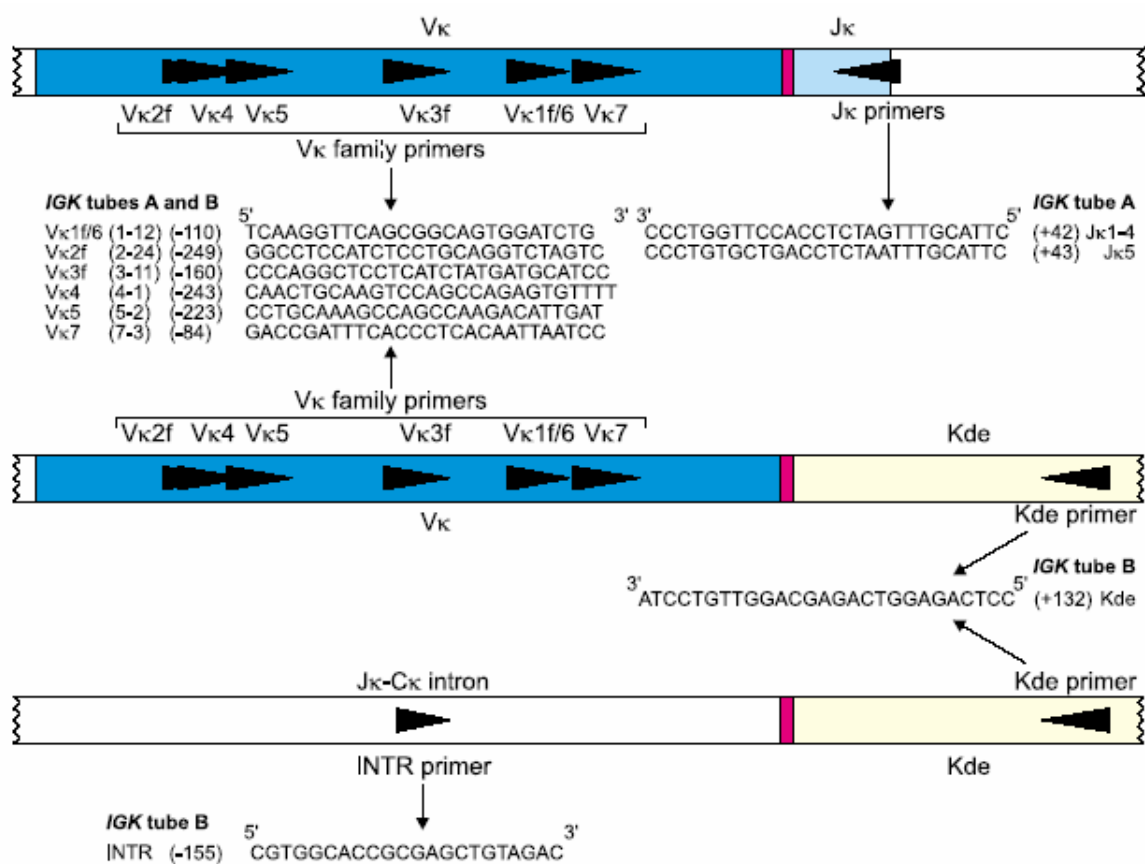
- denaturace 95°C 8:00 minut
- amplifikace 94°C 0:45 minut
- extenze 60°C 0:45 minut
- 72°C 1:30 minut
- 72°C 10:00 minut
- chlazení 15°C ∞ minut
- počet cyklů 35 x

Po získání PCR produktů je třeba odlišit klony s identickými přechodovými oblastmi od polyklonálních lymfoidních buněk. Při malých rozdílech v délce těchto oblastí nelze na agarózovém gelu určit, zda jde o směs různě dlouhých produktů nebo o jediný produkt. Z tohoto důvodu používáme analýzu heteroduplexů na 6% polyakrylamidovém gelu po denaturaci 20µl produktu PCR (5 minut při 95%) následovanou rychlou renaturací (1 hodina 4°C).

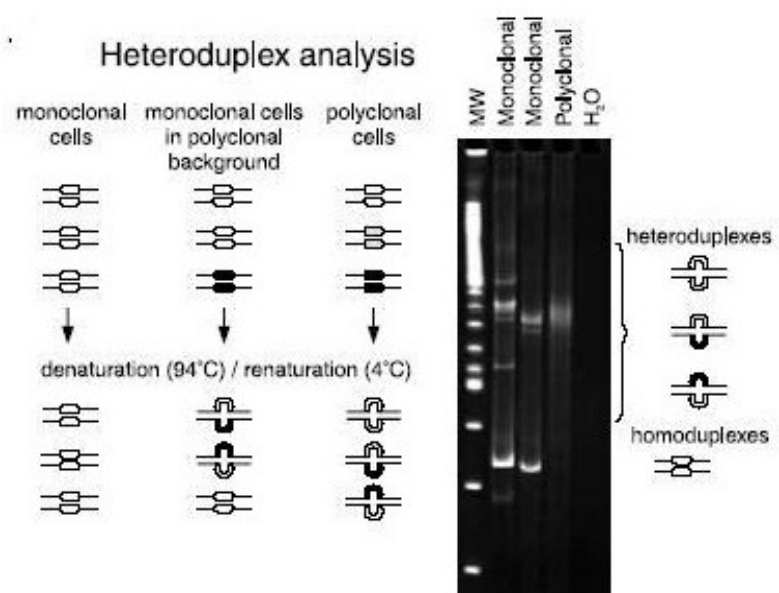
Monoklonální produkty díky stejné rychlosti migrace vytvoří proužek a heteroduplexy vzniklé náhodným spojením polyklonálních produktů migrují v gelu pomaleji a vytvoří neostře ohraničen široký pruh (viz. obr. č. 10).



**obrázek č. 8** Analýza PCR přestavby IgH (VH-JH) s použitím tří sad VH primerů v oblastech FR1, FR2 a FR3 ve VH segmentu a jednoho primeru konsensus JH. Primery jsou nakombinované v multiplexní tuby A (FR1), B (FR2), C (FR3) (van Dongen et al., 2003).



**Obrázek č. 9** PCR analýza přestavby IgK s použitím multiplex primerů v tubě A (V<sub>K</sub>, J<sub>K</sub>) a tubě B (V<sub>K</sub>, intron RSS, primery Kde) (van Dongen et al., 2003).



**Obrázek č. 10** *Heteroduplexní analýza PCR produktu (van Dongen et al., 2003)*

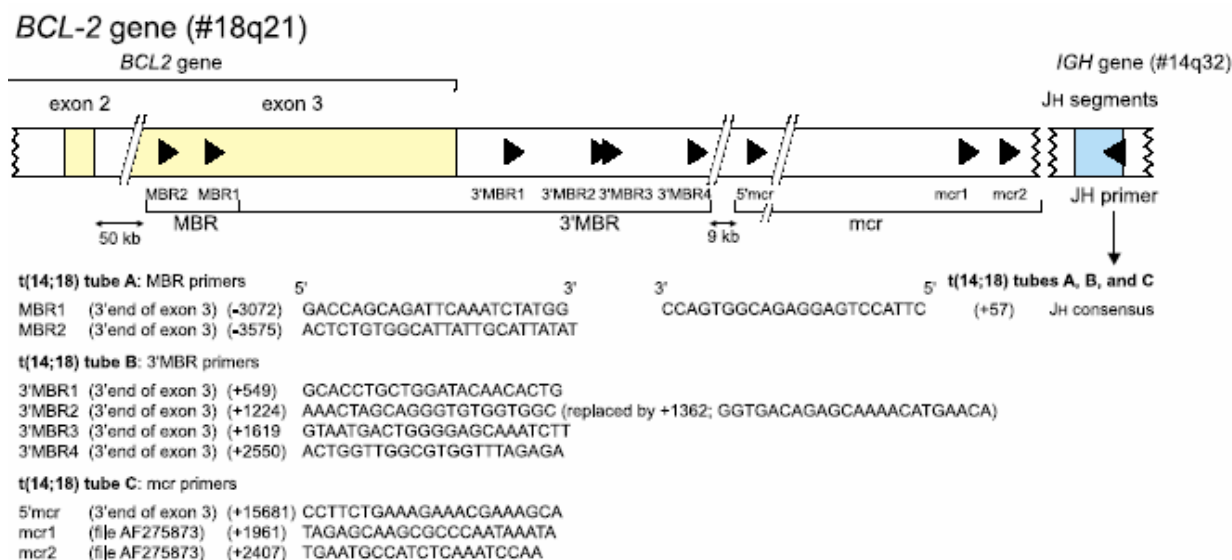
## 7.4 detekce *t(14;18)* MBR, *mcr*

### Reakční podmínky

- 25µl cílového objemu
- 10x pufr
- 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 2mM dNTP
- Taq Gold (5U/uL)
- 10pmol/ µl od každého z použitých primerů (viz obr. č. 11)

### Amplifikační podmínky

- denaturace 95°C 8:00 minut
- amplifikace 94°C 0:45 minut
- extenze 60°C 0:45 minut
- 72°C 1:30 minut
- 72°C 10:00 minut
- chlazení 15°C ∞ minut
- počet cyklů 35 x



**Obrázek č. 11** PCR detekce translokace *BCL/IgH*. Zobrazen gen *BCL-2/IgH* na chromozomovém úseku 18q21. Multiplexní primery jsou navrženy pro častá zlomová místa MBR, 3'MBR a mcr (van Dongen et al., 2003).

## **8 Elektroforéza**

### ***8.1 Elektroforéza na agarózovém gelu***

Elektroforézu na agarózovém gelu provádíme u kontrolních genů Nmyc/bglob, CTRL a t(14;18), MBR, mcr

Pro elektroforézu připravíme 1,5% agarózový gel v roztoku TBE a smícháme 6μl PCR produktu s 2μl bromfenolové modři. Elektroforéza probíhá při 130 V po dobu 30-40 minut. Vizualizaci provádíme při UV světle s následnou fotodokumentací.

### ***8.2 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu***

Elektroforézu na polyakrylamidovém gelu používáme při detekci klonality onemocnění.

Elektroforézu provádíme na 6% polyakrylamidovém gelu s pufrům TBE po dobu 2-3 hodin při 110 V. Poté gel barvíme asi 30 minut v barvicí lázni s ethidium bromidem a vizualizaci provádíme v UV světle s následnou fotodokumentací.

## **Budoucí cíle a směřování práce**

Z dosavadních poznatků týkajících se FL vyplývá, že FL patří mezi těžko vyléčitelná onemocnění, včasná a správná diagnostika spolu s použitím odpovídající léčby zvyšuje pravděpodobnost na dlouhotrvající remisi či úplné vyléčení. Pro zkvalitnění života pacientů s FL a zvýšení efektivity používaných léčebných postupů se přistupuje ke sledování MRN u těchto pacientů.

V budoucnu bychom se chtěli věnovat těmto tématům:

- Detekce translokace t(14;18) a následné sledování MRN u FL
  - Vyhodnocení sekvencí monoklonálních produktů pomocí databází přístupných na internetu.
  - Navrhování pacient-specifických primerů softwarem VECTOR NTI 8 Suite pro sledování MRN a optimalizace systému
- Detekce přestaveb Ig/TCR a spektra těchto přestaveb pro navrhování pacient-specifických primerů a následné sledování MRN u FL
- Sledování hladin exprese genu BCL-2 s možným následným využitím ke sledování MRN

## **Poděkování**

Na závěr bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Markétě Kalinové a spolupracovníkům z Laboratoře molekulární patologie Ústavu patologie a molekulární medicíny 2.LF UK za trpělivost, odbornou radu, čas, který mi věnovali ve svém nabitém programu a v neposlední řadě také za přátelskou pomoc.

## Seznam použitých zkratek

BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-6	B-cell lymphoma 6
BCR	B cell receptor
BH	Bcl-2-homology
bp	base pair
CD	cluster of differentiation
C <sub>H</sub>	konstantní část těžkého imunoglobulinového řetězce
C <sub>L</sub>	konstantní část lehkého imunoglobulinového řetězce
D region	diversity region
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty
EDTA	protisrážlivé činidlo
FC	flow cytometry
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
FL	folikulární lymfom
Ig	imunoglobulinový řetězec
Ig/TCR	klonálně specifická přestavba imunoglobulinu a T-buněčného receptoru
IgH	heavy imunoglobulin
IgH/BCL-2	přestavba imunoglobulinu a genu pro B-cell lymphoma 2
IgL	light imunoglobulin
Ig $\alpha$ ,Ig $\beta$	imunoglobulinové signalizační proteiny
Ig $\kappa$	imunoglobulin $\kappa$
Ig $\lambda$	imunoglobulin $\lambda$
J region	joining region
kb	kilo base
LD	laktátdehydrogenáza
MBR	major breakpoint region
mcr	minor cluster region
MDR protein	multidrug resistance protein
MRN	minimální reziduální nemoc



mRNA	messenger RNA
NHL	Non-Hodkin's lymphoma
NK	natural kill cell
p53	nádorový supresor
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
pro-B	progenitor B lymfocytu
RAG	recombination activating gene
RQ-PCR	real-time quantitative PCR
RSS	recombination signal sequences
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SIg+	povrchový imunoglobulin
TCR	T cell receptor
V region	variabilty region
V <sub>H</sub>	variabilní doména těžkého imunoglobulinového řetězce
V <sub>L</sub>	variabilní doména lehkého imunoglobulinového řetězce
WHO	World Healthy Organization
ψL	náhradní IgL

## **Seznam použité literatury**

Akasaka T., Muramatsu M., Ohno H., Miura I., Tatsumi E., Fukuhara S., Mori T., Okuma M., 1996, Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms, *Blood*, 88, 985-994

Arber D.A., 2000, Molecular diagnostic approach to Non-Hodkin's lymphoma, *J.Mo.Dignostics*, 178-190

Bras M., Queenan B., and Susin S. A., Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying, 2004, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, No. 2, 2005, pp. 231-239. Translated from *Biokhimiya*, Vol. 70, No. 2, 2005, pp. 284-293. Original Russian Text Copyright © 2005 by Bras, Queenan, Susin.

Campana D., Pui C.H., 1995, Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance, *Blood*, 85(6), 1416-34

Cavé H., Guidal C., Elion J., Vilmer E., Grandchamp B., 1996, A low rate of loss of heterozygosity is found at many different loci in childhood B-lineage acute lymphocytic leukemia, *Leukemia*, 10, 1486-1491

Cleary M.L., Galili N., Sklar J., 1986, Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas, *J Exp Med*, 164, 315-320

Cleary M.L., Sklar J., 1985, Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7439-7443

Coffey J., Hodgson D.C., Gospodarowicz M.K., 2003, Therapy of non-Hodgkin's lymphoma, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30 Suppl 1:S28-36. Epub 2003 Apr 12.

Cottliar A.S.H., Noriega M.F., Narbaitz M., Rodríguez A., Slautsky I.R., 2006 Association between telomere length and BCL2 gene rearrangements in low- and high - grade non-Hodgkin lymphomas, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 171, 1-8

Cottliar A.S.H., Noriega M.F., Narbaitz M., Rodríguez A., Slavutsky I.R., 2006, Association between telomere length and BCL2 gene rearrangements in low- and high-grade non-Hodgkin lymphomas, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 171, 1-8

Coultas L., Strasser A., 2003, The role of the Bcl-2 protein family in cancer, *Semin Cancer Biol*, 13, 115-123

Daniel N.N., Korsmeyer S.J., 2004, Cell death: critical control points, *Cell*, 116, 205-19

Davis M.M. and Bjorkman P.J., 1988, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition, *Nature*, 344(6181), 395-402

Dolken L., Schuler F., Dolken G., 1998, Quantitative detection of t(14;18)- positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes, *Biotechniques*, 6, 1058-1064

Froland S.S., Natvig J.B., 1972, Class, subclass, and allelic exclusion of membranebound Ig of human B lymphocytes, *J Exp Med*, 136(2), 409-14

Galimberti S., Guerrini F., Morabito F. *et al.*, , 2003, Quantitative molecular evaluation in autotransplant programs for follicular lymphoma: efficacy of in vivo purging by rituximab, *Bone Marrow Transplant*, 32, 57-63

Gilbert S.F., 2006, A companion to Developmental Biology, Eighth Edition, published by Sinauer Associates

Gribben J.G., Neuberg D., Barber M. *et al.*, 1994, Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow, *Blood*, 84, 3800-3807

Hayashi K. *et al.*, , 2003, Distinct signaling requirements for Dmu selection, IgH allelic exclusion, pre-B cell transition, and tumor suppression in B cell progenitors, *Immunity*, 18(6), 825-36

Heim S., Mitelman F., 1995, *Cancer cytogenetics*, John Wiley & Sons, 536 s.

Hirt C., Dolken G., 2000, Quantitative detection of the t(14;18) - positive cells in patients with follicular lymphoma before and after autologous bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 25, 419-426

Hirt C., Schuler F., Dolken G., 2003, Minimal residual disease (MRD) in follicular lymphoma in the era of immunotherapy with rituximab., *Semin Cancer Biol*, 13(3), 223-31

Horsman D.E., Gascoyne R.D., Coupland R.W., Coldman A.J., Adomat S.A., 1995, Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for detection of t(14;18) in follicular lymphoma, *Am J Clin Pathol*, 103, 472-478

Hořejší V., Bartůňková J., 2001, *Základy imunologie*, Triton, 26-27, 52-59, 110-114

Chittenden T., 2002, BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis, *Cancer Cell*, 165-166

Janeway C., 2001, *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*. New York, Garland Pub

Jiang F., Lin F., Price R., Gu J., Medeiros L.J., Zhang H.Z., Xie S., Caraway N.P., Katz R.L., 2002, Rapid Detection of IgH/BCL2 Rearrangement in Follicular Lymphoma by Interphase Fluorescence in Situ Hybridization with Bacterial Artificial Chromosome Probes, *J Mol Diagn*, 4, 144-149

Krsková L., Hilská I., Kopecká P., Soukup J., Kodet R., 2004, Molekulární diagnostika maligních lymfomů řady B: detekce klonality a stručný přehled problematiky s vlastními výsledky, *Časopis lékařů českých*, 143, pp. 191-194

Ladetto M., Sametti S., Donovan J.W. *et al.*, 2001, A validated real-time quantitative PCR approach shows a correlation between tumor burden and successful ex vivo purging in follicular lymphoma patients, *Exp Hematol*, 29, 183-193

Lopez-Guillermo A., Cabanillas F., McDonnell T.I., *et al.*, 1999, Correlation of Bcl-2 rearrangement with clinical characteristic and outcome in indolent follicular lymphoma, *Blood*, 93, 3081-3087

López-Guillermo A., Cabanillas F., McLaughlin P. *et al.*, 1998, The clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphoma, *Blood*, 91, 2955-2960

Macintyre E., Willerford D. and Morfia S.W., 2000, Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma, *American Society of Hematology*, 180-204

Masopust J., Průša R., 2003, *Patobiochemie buňky*, Universita Karlova, 2.LF Praha

Mastuda F., 1998, The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, *J Exp Med*, 188(11), 2151-62

Matsuuchi L., Gold M.R., 2001, New views of BCR structure and organization, *Current Opinion in Immunology*, 13, 270-277

Mayer J., 2001, Folikulární lymfomy, *Masarykova Univerzita*, 11, 13-16

Meijerink J.P.P., 1997, t(14;18), a journey to eternity, *Leukemia*, 11, 2175-2187

Nagata K., Nakamura T., Kitamura F., Kuramochi S., Taki S., Campbell K.S. and Karasuyama H., 1997, The Igα/Igβ heterodimer on μ-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation, *Immunity*, 7, 559–570

Pattingre S., Levin B., 2006, Bcl-2 Inhibition of Autophagy: A New Route to Cancer, *Cancer Res*, 66(6), 2885-2888

Poetsch M., Weber-Matthiesen K., Plendl H.J., Grote W., Schlegelberger B., 1996, Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast-artificial-chromosome probes in follicular lymphoma and non-neoplastic lymphoproliferation., J Clin Oncol, 14, 963-969

Pui Ch., Schrappe M., Ribereiro R., Niemeyer C. M., 2004, Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 118-45

Rambaldi A., Carlotti E., Oldani E., Starza I.D., Baccarani M., Cortelazzo S., Lauria F., Arcaini L., Morra E., Pulsoni A., Rigacci L., Rupolo M., Zaja F., Zinzani P.L., Barbui T., Foa R., 2005, Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodkin Lymphoma, Blood 88, 105;3428-3433

Reed J.C., 1998, Bcl-2 family proteins, Oncogene, 17, 3225-36

Rejthar A., Vojtěšek B., 2002, Obecná patologie nádorového růstu, Grada, 16, 26-30, 63-65, 147, 175-176

Ryungsa K., Manabu E.K.T., Tetsuya T., 2004, Therapeutic Potential of Antisense Bcl-2 as a Chemosensitizer for Cancer Therapy, Wiley InterScience, Cancer, 2491-2502

Schraders M., Jong D., Kluin P., Groenen P., van Krieken H., 2005, Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation, Journal of Pathology, 205, 329-335

Slater D.N., 2005, The new World Health Organization–European Organization for Research and Treatment of Cancer classification for cutaneous lymphomas: a practical marriage of two giants, British Journal of Dermatology, 153(5), 874-80

Summers K.E., Davies A.J., Matthews J., Jenner M.J., Cornelius V., Amess J.A. Norton A.J., Rahatiner A.Z., Fitzgibbon J., Lister T.A., Goff L.K., 2002, The relative role of peripheral blood and bone marrow for monitoring molecular evidence of disease in follicular lymphoma by quantitative real-time polymerase chain reaction, Br J Haematol, 118, 563-566

Takahashi T., Hara T., Yoshikawa T., Shimomura Y., Tsurumi H., Yamada T., Tomita E., Moriwaki H., 2005, Early transformation from follicular lymphoma to Burkitt lymphoma, *Rinsho Ketsueki*, 46(9),1055-9

Tsujimoto Y., Croce C.M., 1986, Analysis of the structure , transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involded in human follicular lymphoma, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 5214-5218

Tysarowski A., Fabisiewicz A., Paszkiewicz-Kozik E., Kulik J., Walewski J., Siedlecki J.A., 2007, Useful of reali-tme PCR in long-term follow-up of follicular lymphoma patinets, *Acta Biochimica Polonica*, 1, 135-142

van der Velden V.H.J., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen J. J.M., 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects , *Leukemia*, 17, 1013-1034

van Dongen, Lngerak A.W., Bruggemann M., Evans P.A.S., Hummel M., Lavender, Delabesse E., Davi F., Schuurung E., García-Sanz R., van Krieken J.H.J.M., Droese J., González D., Bastrad C., White H.E., Spaargaren M., Gonález M., Parreira A., Smith J.L., Margan G.J., Kneba M., McIntyre E.A., 2003, Design and standardization of PCR primers and protocols for detection af clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombination in sispect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 cencerted Action BMH4-CT98-3936, *Leukemia*, 17, 2257-2317

Vega F, Medeiros J., Lutra R., 2002, Taqman PCR In The Detection And Quantification Of Chromosomal Translocations In Follicular Lymphoma, Mantle Cell Lymphoma And Chronic Myeloid Leukemia: Taqman Real-time PCR Essay, *The Internet Journal of Patology*, Volume 2, Number 1

Vinuesa C.G., Cook M.C., 2001, The Molecular Basis of Lymphoid Architecture and B cell Responses: Implications for Immunodeficiency and Immunopathology, *Current Molecular Medicine*, 1, 689-725

Winter J.N., Gascoyne R.D., Van Besien K., 2004, Low-grade lymphoma, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 203-20.

Yang E., Korsmeyer S.J., 1996, Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death , Blood , 88, 386-401

Young N.A., 2006, Grading follicular lymphoma on fine-needle aspiration specimens--a practical approach, Cancer, 25, 108(1), 1-9

Yuen A.R., Kamel O.W., Halpern J., Horning S.J., 1995, Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma, J Clin. Oncol. 13, 1726-1733

Zehentner R.B. ,Barbara K., Wayne Fritschle, Tess Stelzer, Keely M. Ghirardelli, Kimberly Hunter, Collette Wentzel, Richard Bennington, Christian L. Hansen, David Myerson<sup>2</sup>, Michael Kalnoski<sup>1</sup>, Denise A. Wells<sup>1</sup> and Michael R. Loken<sup>1</sup> ,2006, Minimal Disease Detection and Confirmation in Hematologic Malignancies: Combining Cell Sorting with Clonality Profiling, Clinical Chemistry, 52:430-437